

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 250–252, Mai 1969

## Amino-peptidaseaktivität gegen Angiotensin II-Amid im Serum von Gesunden, Schwangeren, Hypertonikern und Leberkranken

Von IRMGARD URSULA V. GOLDACKER und W. OELKERS

*Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik Berlin (Direktor: Prof. Dr. M. Schwab)*

(Eingegangen am 17. Dezember 1968)

Bei Gesunden, Schwangeren, Hypertonikern und Leberkranken wurde die Amino-peptidase-Aktivität des Serums gegenüber  $\alpha$ -L-Asparaginyll-Angiotensin II mit einem NADH-abhängigen optischen Test bestimmt. Nur bei Leberkranken (akute Hepatitis, Leberzirrhose und Verschlaußikterus) finden sich erhöhte „Angiotensinase“-Aktivitäten. Bei Schwangeren im dritten Trimenon ist die Leucin-Amino-peptidase-Aktivität (LAP) im Plasma deutlich erhöht. Zwischen den Aktivitäten der „Angiotensinase“ und der LAP besteht keine signifikante Korrelation, während die Korrelation bei Lebererkrankungen hoch signifikant ist.

*The activity of amino-peptidase towards angiotensin II-amide in the serum during normal health, pregnancy, hypertension and liver disease*

The amino-peptidase activity in the serum of healthy persons, pregnant women and of patients with hypertension and liver diseases was measured by a NADH-dependant optical test with the substrate  $\alpha$ -L-Asparaginyll-Angiotensin II. Increased „angiotensinase“-activity was found only in liver diseases (acute hepatitis, cirrhosis, obstructive jaundice). During the third trimester of pregnancy, serum leucine-amino-peptidase-activity is increased. There is no significant correlation between „angiotensinase“-activity and serum leucine-amino-peptidase-activity in pregnancy, while the correlation of the two enzyme activities is highly significant in liver diseases.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der enzymatischen Inaktivierung von Angiotensin II im Blutplasma ist die Hydrolyse der N-terminalen Peptidbindungen (1, 2, 3, 4). Endopeptidasen spielen nur eine untergeordnete Rolle (1). Bei früheren Untersuchungen über die Inaktivierung von Angiotensin durch Plasma oder Serum von Gesunden, Hochdruck- und Leberkranken wurden mit einer Ausnahme (3) Methoden verwendet, die keine exakte Messung von Enzymaktivitäten gestatteten.

Wir haben eine Methode entwickelt, mit der der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Angiotensin-Inaktivierung, die Abspaltung von Asparaginsäure aus dem „natürlichen“ Angiotensin II und von Asparagin aus dem synthetischen Angiotensin II-Amid direkt gemessen werden kann (4). Routinemäßige Bestimmungen der „Angiotensinase“-Aktivität im Plasma mit Aspartyll-Angiotensin II als Substrat konnten bisher nicht durchgeführt werden, da uns das Peptid nicht in genügender Menge zur Verfügung stand. Wir berichten im folgenden über die Ergebnisse von 117 Bestimmungen der Amino-peptidase-Aktivität gegen Asparaginyll-Angiotensin II im Serum von Gesunden, Schwangeren, Hochdruck- und Leberkranken. Mit dieser Untersuchung sollen früher mitgeteilte, sich zum Teil widersprechende Ergebnisse (5, 6, 7) überprüft werden. Die biologische Relevanz von Untersuchungen mit diesem Substrat ist allerdings gering, da Aspartyll- bzw. Asparaginyll-Angiotensin II offenbar durch verschiedene Enzyme oder Enzymgruppen gespalten werden (1, 2, 4). Da Asparaginyll-Angiotensin II (Angiotensin II-Amid) u. a. auch von Leucinamino-peptidase gespalten wird (1), be-

stimmten wir bei Leberkranken und Schwangeren auch die Aktivität der Leucin-Amino-peptidase<sup>1)</sup>.

### Methodik

*Prinzip der Methode zur Bestimmung der „Angiotensinase“ (ATase) nach (4)*

Verdünntes Serum wird mit einem zuvor ermittelten Substratüberschuß ((Asparaginyll-Val<sup>8</sup>-Angiotensin II (Hypertensin CIBA)) inkubiert. Das freigesetzte Asparagin wird durch Asparaginase (gewonnen aus Meerschweinchenserum) in Asparaginsäure überführt. Asparaginsäure wird mit einem NADH-abhängigen optischen Test (Hilfsenzyme: Aspartat-Aminotransferase und Malatdehydrogenase) bestimmt. Die Ergebnisse werden in IE//Serum angegeben. Der mittlere relative Fehler einer Einzelbestimmung bei Aktivitäten zwischen 8 und 30 IE//l ist  $2,7\% \pm 3,1\%$  (SD). Der mittlere absolute Fehler ist  $0,39 \text{ IE//l} \pm 0,37 \text{ IE//l}$ .

### *Leucin-Amino-peptidase-Aktivität*

Die Aktivität der Leucin-Amino-peptidase (LAP) im Serum wurde mit dem LAP-Farbttest der Fa. Boehringer, Mannheim bestimmt (Normalwerte: 8–22 mU/ml).

### Ergebnisse

Tabelle 1 und Abbildung 1 zeigen: Der Mittelwert von 26 ATase-Bestimmungen bei Gesunden beträgt  $12,3 \text{ IE//l} \pm 4,1 \text{ IE//l}$  (SD). Die Mittelwerte der ATase-Aktivität im Serum von 21 Patienten mit „essentieller“ Hypertonie, 15 Patienten mit Nierenarterienstenosen und Hypertonie und 10 Patienten mit Nierenparenchymerkrankungen und Hypertonie sind von dem der Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden. Nur bei 2 Patienten mit Nierenarterienstenose lag die ATase-Aktivität im Serum über der oberen Normgrenze. Bei

<sup>1)</sup> LAP = Leucin-Amino-peptidase (EC 3.4.1.1)

Tab. 1

Mittelwerte der ATase-Aktivität mit Extremwerten und Standardabweichungen in den verschiedenen Gruppen. Mittelwerte der LAP-Aktivität mit Extremwerten bei Leberkranken und Schwangeren im I. und III. Trimenon

Gruppe	Diagnose	n	Alter (X)	Blutdruck (mm Hg) (X)	Angiotensinase mU/ml (X u. Bereich)	= SD	n	LAP mU/ml (X u. Bereich)
I	Gesunde	26	32	123/80	12,3 6,3—18,6	4,1		
II	Essentielle Hypertonie	21	38	180/110	12,9 6,8—17,6	3,2		
III	Nierenarterienstenose und Hypertonie	15	45	206/118	13,6 5,5—22,8	5,3		
IV	Bds. Nierenkrankheiten und Hypertonie	10	38	155/96	11,6 5,7—17,9	2,4		
V	Hepatitis epidemica	6	43	121/70	30,0 12,0—48,0	13,4	6	69,0 37—122
	Leberzirrhose	9	56	127/79	19,2 12,1—34,3	6,7	3	55,4 31—71
	Verschlußikterus	2	73	125/70	23,1 20,6—25,6		1	43,2
VI	Graviditas I. Trimenon	14			10,5 4,2—16,9	3,8	7	20,0 4—44
VIII	Graviditas III. Trimenon	14			10,6 6,5—17,4	3,5	5	88,9 72—139

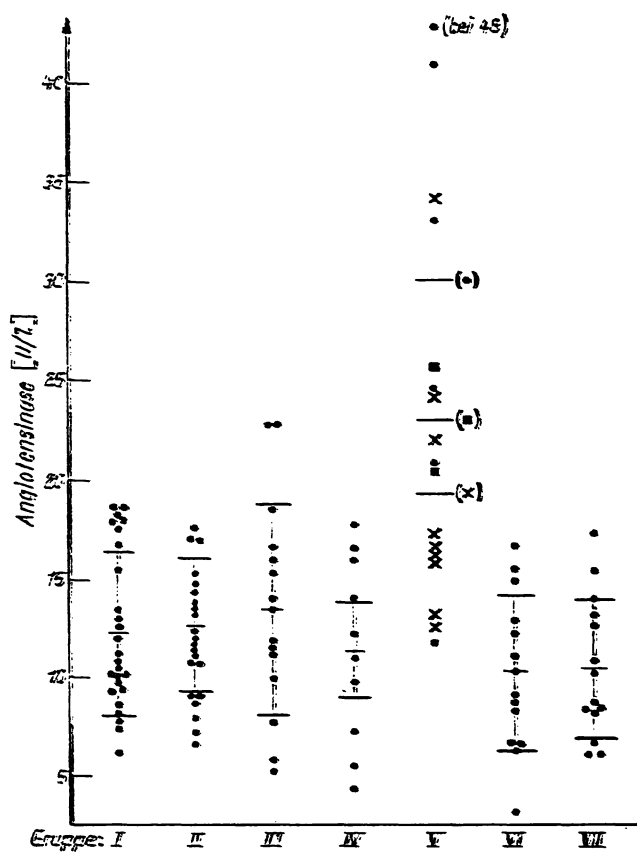


Abb. 1  
Einzelergebnisse von ATase-Bestimmungen mit Gruppenmittelwerten und einfacher Standardabweichung (vgl. Tab. 1). Erklärung der Symbole für Gruppe 5 siehe Abbildung 2

Patienten mit infektiöser Hepatitis, Leberzirrhose und Verschlußikterus sind die Mittelwerte der ATase-Aktivität in den einzelnen Gruppen deutlich höher als bei den Gesunden. Bei Schwangeren im 1. und 3. Trimenon der Gravidität ist die ATase-Aktivität normal. Während bei Schwangeren im 1. Trimenon der Gravidität die LAP-Aktivität im Mittel nur leicht erhöht ist, wurden im 3. Trimenon stark erhöhte LAP-Aktivitäten gemessen. Die Korrelation zwischen ATase- und LAP-Aktivität ist nicht signifikant ( $r = -0,49$ ;  $p = 0,1-0,05$ ). Bei Leberkranken ist jedoch eine hochsignifikante Korrelation zwischen ATase- und LAP-Aktivitäten festzustellen ( $r = +0,79$ ;  $p < 0,001$ ).

### Diskussion

Unsere Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen von KLAUS und Mitarbeitern (9) überein. Es ist wahrscheinlich, daß mit beiden Methoden der gleiche Parameter gemessen wird. KLAUS und Mitarbeiter bestimmen nach Inkubation von Serum mit Angiotensin-Amid das durch die Serum-Peptidasen freigesetzte Valin papierchromatographisch (3).

Die ATase-Aktivität mit Asparaginyll-Angiotensin II als Substrat ist bei Hypertonikern nicht erhöht oder erniedrigt. Wir haben früher weiterhin festgestellt, daß bei Hypertonikern keine Korrelation zwischen der ATase-Aktivität im Serum und der oft veränderten Blutdruckwirkung von infundiertem Angiotensin be-

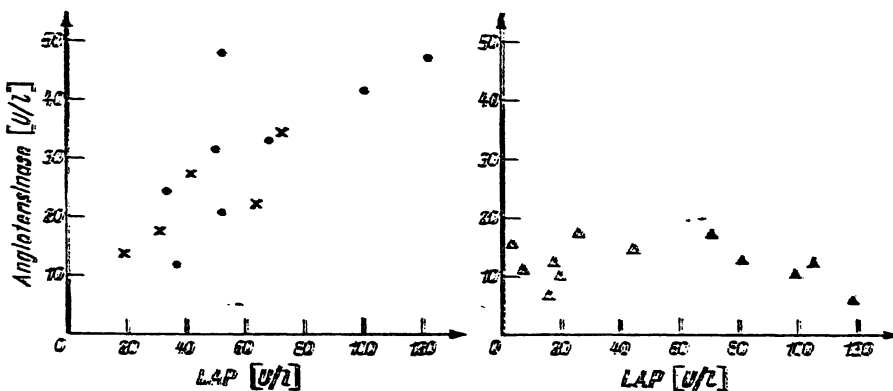


Abb. 2  
Beziehungen zwischen der ATase- und der LAP-Aktivität bei Leberkranken (links) und Schwangeren im I. und III. Trimenon der Schwangerschaft (rechts)

Leberkranke:  
• Hepatitis epidemica  
x Leberzirrhose  
■ Verschlußikterus  
△ Graviditas I. Trimenon  
▲ Graviditas III. Trimenon  
Leberkranke:  
 $r_{\text{ATase-LAP}} = +0,79$ ;  $p < 0,001$   
Schwangere:  
 $r_{\text{ATase-LAP}} = -0,49$ ;  $p = 0,05-0,1$

steht (8). Die in vielen Fällen gesteigerte Angiotensinempfindlichkeit bei Patienten mit „essentieller“ Hypertonie und die verminderte Blutdruckwirkung bei manchen Patienten mit renovaskulärer Hypertonie ist also nicht durch eine unterschiedliche Inaktivierungsgeschwindigkeit des Peptids im Plasma bedingt. HODGE und Mitarbeiter (9) fanden darüberhinaus, daß die mit Hilfe eines biologischen Präparates bestimmte Halbwertszeit von Asparaginsyl-Angiotensin II nach intraarterieller Infusion beim Hund (etwa 20 Sek.) wesentlich kürzer ist als die Halbwertszeit im extrakorporal zirkulierenden Vollblut (etwa 140 Sek.). Die Inaktivierung von Angiotensin wird durch den Kontakt mit durchströmten Parenchym-Organen (Leber, Hirn, Muskulatur) offenbar erheblich beschleunigt. Interessant ist die schon von KLATS und Mitarbeitern beobachtete synonyme Erhöhung der ATase- und LAP-Aktivität im Serum von Leberkranken, während die gesteigerte LAP-Aktivität im 3. Schwangerschaftstrimenon nicht

von einer erhöhten ATase-Aktivität begleitet ist. Wir sind der Ansicht, daß der divergente Befund bei Schwangeren nicht als Argument gegen die gesteigerte Aktivität eines oder mehrerer sowohl Angiotensin II-Amid als auch L-Leucin-*p*-Naphthylamid spaltenden Enzyme bei Leberkranken gelten kann. Die LAP-Aktivität im Serum Gesunder läßt sich durch Chromatographie an DEAE-Cellulose in 4 Komponenten mit unterschiedlichen relativen Substratspezifitäten auftrennen (11). Bei Patienten mit Lebererkrankungen und bei Schwangeren kann die Aktivitätssteigerung der LAP durch Vermehrung unterschiedlicher Enzymfraktionen bedingt sein (12), deren unterschiedliche relative Substratspezifitäten unsere Befunde erklären könnten. Daß auch für die biologische Inaktivierung von Angiotensin II-Amid durch menschliches Plasma verschiedene Enzyme mit verschiedenen pH-Optima in Frage kommen, geht aus der folgenden Mitteilung hervor.

### Literatur

1. REGOLI, D., B. RINKER und H. BRUNNER, *Biochem. Pharmacol.* **12**, 637 (1963). — 2. NAGAI, L., L. GILLESPIE, J. E. FOLK und G. G. GLENNER, *Biochem. Pharmacol.* **14**, 721 (1965). — 3. KLATS, D., H. KAFFARNIK und H. PFEIL, *Klin. Wschr.* **41**, 376 (1963). — 4. OELKERS, W. und L. U. v. GOLDACKER, *Klin. Wschr.* **45**, 649 (1967). — 5. HICKLER, R. B., D. P. LAULER und G. W. THORN, *J. Clin. Invest.* **42**, 625 (1963). — 6. LUBASH, G. D., E. C. HAMMEL, und R. J. MEARLEY, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* **18**, 439 (1967). — 7. OSBORN, E. C., G. JERTYS und B. A. JEFF, *Cardiovasc. Res.* **2**, 35 (1968). — 8. OELKERS, W., H. J. LANGHOLTZ und L. U. v. GOLDACKER, *Zschr. Kreisf. Forsch.* **57**, 457 (1968). — 9. HODGE, R. L., K. K. F. NG und J. R. VANE, *Nature London* **215**, 138 (1967). — 10. KLATS, D., H. KAFFARNIK und H. PFEIL, *Klin. Wschr.* **41**, 380 (1963). — 11. BEHAL, F. J., R. D. HAMILTON, C. B. KAVANAGE und E. C. KELLY, *Arch. Biochem. Biophysics* **100**, 308 (1963). — 12. SMITH, E. E., E. P. PINEDA und A. M. RUTHENBURG, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N. Y.)* **110**, 683 (1962).

L. U. v. Goldacker und Dr. med. W. Oelkers  
1 Berlin 45  
Hindenburg-Damm 30